Agilent MassHunter ワークステーション ソフトウェア – 7000A トリプル四重極 GC/MS 用データ測定

ファミリアリゼーションガイド

始めに 3
システムの準備 3
データ取り込みに必要なサンプルの準備 3
実習 – 7000A のデータ測定メソッドの開発 5
タスク 1. 注入口と注入パラメータの設定 5
タスク 2. GC 測定パラメータの設定 7
タスク 3. プリカーサイオンを検出するための測定メソッドの作成 11
タスク 4. プリカーサイオンのスキャンデータの測定（オプション） 13
タスク 5. プリカーサイオン質量の決定 15
タスク 6. プロダクトイオン質量を検出するための測定メソッドの作成 18
タスク 7. プロダクトイオンを検出するためスキャンデータの測定（オプション） 21
タスク 8. プロダクトイオンの決定 23
タスク 9. MRM メソッドの作成 26
実習 – 定量分析メソッドの作成 28
タスク 10. MRM データの測定（オプション） 28
タスク 11. 定量分析バッチの作成 31
タスク 12. MRM 定量分析メソッドの作成 33
タスク 13. 未知サンプルのバッチを定量 42

Agilent Technologies

このガイドは、Agilent 7000A トリプル四重極 GC/MS を使用して、サンプルデータを取り込み、解析する方法を説明しています。このガイドのデータ取り込みステップを省略する場合は、システム付属（データ測定インストールディスクの **Benzodiazepine\Data** フォルダ中の）Benzodiazepine ディレクトリにあるデモデータファイルを使用してください。

このガイドでは、対象化合物を分析するのに最適な測定パラメータを決定する方法を学習します。これらの説明から、最高感度のデータを取得するために、機器パラメー タを最適化するメソッドの設定方法や、定性分析プログラムを使用して、最適なシグナルレスポ ンスを得るためのパラメータ値を特定する方法を学習できます。『定性分析ファミリアリゼーションガイド』を用いて、定性分析プログラムについても学習でき、また『定量分析ファミリアリゼーションガイド』を用いて、定量分析プログラムについても学習できます。

トリプル四重極質量型分析計の動作方法と衝突エネルギー電圧の重要性に関する詳細は、『コンセプトガイド』を参照してください。背景情報に関しては、『コンセプトガイド』の 3 章「Agilent Triple Quad MS と感度」を参照してください。プログラムの動作方法の詳細は、オンラインヘルプを参照してください。

実習方法を示す表は、以下の 3 列に分けて表示されています。

- ステップ – 操作概要です。各自でプログラムを実行します。
- 詳細説明 – ステップの実行に必要な手順を示しています。
- コメント – 実習の各ステップに関するヒントや追加情報を記します。

始めに

始めに、ご使用のシステムの準備が整っているかを確認してください。データ測定を行う場合は、機器を設定する必要もあります。

システムの準備

1 以下を確認します。
   - データ測定、定性分析プログラム、および定量分析プログラムがインストールされている。
   - スプリット / スプリットレス注入口およびオートサンプラを備えた Agilent 7890A GC システムを使用している。
   - 7000A トリプル四重極 GC/MS がコンフィグレーションされている。
   - 性能を検証してある。
   - システムの電源が入っている。
   - HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane: 30 m x 250 µm x 0.25 µm カラムが取り付けられている。
2 Agilent HP-5MS カラムに GC をコンフィグレーションします。
3 データファイルをご使用の PC にコピーします。
4 データ測定インストールディスクの **Benzodiazepine\Data** フォルダにあるデータファイルをご使用のハードディスクの任意の場所にコピーします。このフォルダには、この実習に必要なデータファイルが含まれています。

   ファイルがオリジナルからコピーされており、使用したのが自分のみで変更されていないことが明らかな場合以外は、既にシステム上にある Benzodiazepine データを再使用しないでください。サンプル情報を調べたり、レポートを印刷するために、これらのサンプルデータファイルを使用しないでください。

データ取り込みに必要なサンプルの準備

データ測定を行わずに、メソッド開発のための定性分析プログラムおよび定量分析プログラムの使用方法を学習する場合、このステップは省略できます。定性分析プログラムおよび定量分析プログラムの使用方法は、システムに付属のベンゾジアゼピンデータファイルで学習できます。

サンプルの準備に必要なもの：

- ベンゾジアゼピン混合液サンプルの 1 mL アンプル 1 個、Agilent 部品番号 B-033。
- サンプル希釈用アセトニトリル
- サンプルバイアル

1 定性分析サンプルを準備します。
   a アンプルからベンゾジアゼピンをガラスバイアルまたはガラス管内のアセトニトリルに加え、最終濃度が 10 ng/µL になるように、2 倍に希釈します。
   b 上で得た溶液を使用して、ALS サンプルバイアルを 10 本準備します。
2 定量分析キャリブレーションサンプルを準備します。
   a 最終濃度が 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 ng/µL になるように、アンプルからベンゾジアゼピンを Eppendorf バイアル内のアセトニトリルに加えます
   b 上で得た 5 つの濃度の溶液用に ALS サンプルバイアルを 5 本準備します。バイアルに BenzoL1 ～ BenzoL5 のラベルを付けます。
3 定量分析キャリブレーション未知サンプルを準備します。
   a アンプルからベンゾジアゼピンをガラスバイアルまたはガラス管内のアセトニトリルに加え、最終濃度が 0.4、0.2、0.1 ng/µL になるように希釈します。
   b 上で得た溶液用に ALS サンプルバイアルを 3 本準備します。バイアルに BenzoSample01 ～ BenzoSample03 のラベルを付けます。

この実習の前に、機器をオートチューンしてください。機器のチューニングに関する説明は、『操作マニュアル』またはオンラインヘルプを参照してください。

実習 – 7000A のデータ測定メソッドの開発

タスク 1. 注入口と注入パラメータの設定

ステップ	詳細説明	コメント
1 注入口、注入源を設定し、7000A を有効にします。	a Windows デスクトップの [データ測定] アイコンをダブルクリックします。 b [注入口と注入パラメータ] アイコンをクリックします。 c サンプル注入口に [GC] を、注入方法に ALS を選択します。 d [MS 使用] チェックボックスをオンにします。	• 図 1[データ測定] ウィンドウが表示されます。 • 図 2[注入口と注入パラメータ] ダイアログボックスが表示されます。

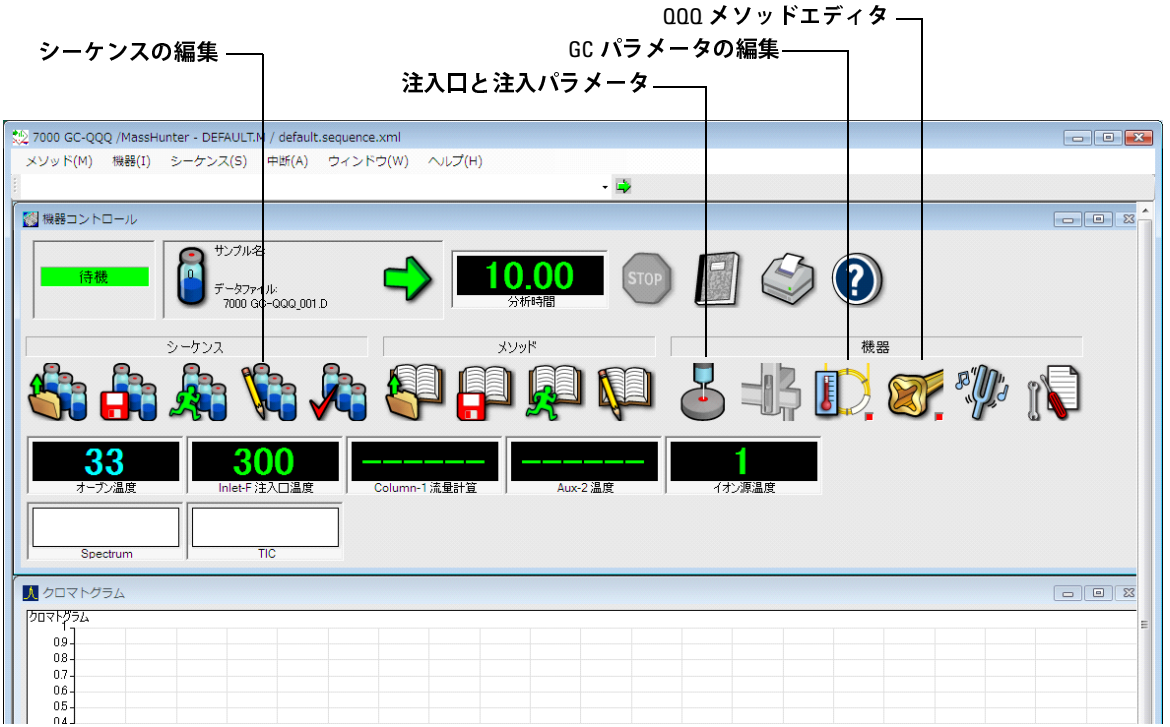


図 1 Agilent MassHunter ワークステーション ソフトウェア - [データ測定] ウィンドウ

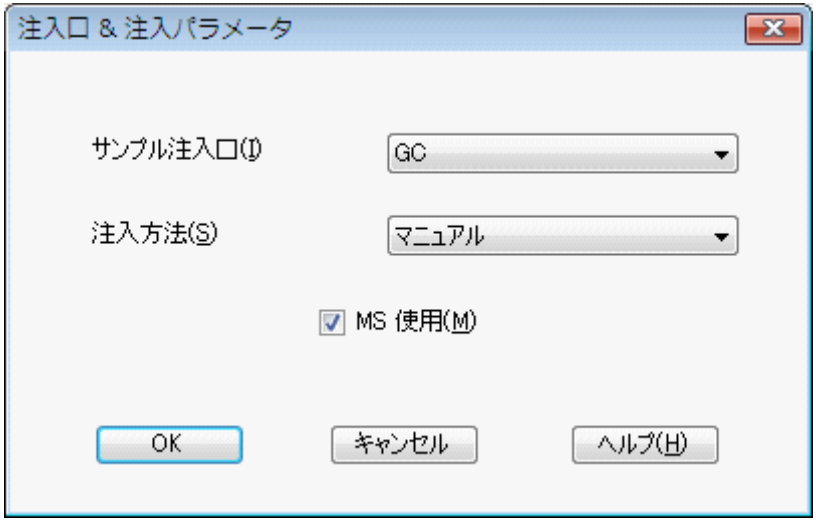


図 2　注入口と注入パラメータ

タスク 2. GC 測定パラメータの設定

この実習では、分析する GC の条件を設定します。

ステップ	詳細説明	コメント
2 ベンゾジアゼピン混合液に適した GC パラメータを設定します。 表 1 を参照してください。	a [GC パラメータ編集] アイコン（図 1）をクリックします。	• 8 ページの図 3[GC パラメータ編集] ウィンドウが表示されます。
	b [CFT 設定] アイコンを選択してから、カラム 1 を選択します。	• ウィンドウが選択された状態で、アイコンの上にマウスを移動すると、アイコンを特定できるツールのヒントが表示されます。
	c コントロールモード [オン] にしてから、[流量] モードを選択します。初期値およびポストラン値に 1.2 mL/min を入力します。	
	d コリジョンセル [N2 EPC モジュール] を選択して、コントロールモードの [オン] を選択解除します。	• このメソッドではコリジョンセルガスの流量はオフです。
	e コリジョンセル [He EPC モジュール] を選択して、コントロールモードの [オン] を選択解除します。	
	f [注入口] アイコンを選択し、[SSL] タブを選択、表 1 にリストされている注入口パラメータを入力します。	
	g [オーブン] アイコンを選択し、表 1 にリストされているオーブンパラメータを入力します。	
	h [ALS] アイコンを選択し、[フロントインジェクタ] タブを選択、表 1 にリストされているインジェクタパラメータを入力します。	• ALS がバック注入口に接続されている場合は、[バックインジェクタ] タブを選択します。
	i [Aux ヒーター] アイコンを選択し、Aux 温度を ON にして、温度を 134 ℃に設定します。	
	j [OK] ボタンを選択します。	• GC パラメータが GC にダウンロードされ、ウィンドウが閉じます。

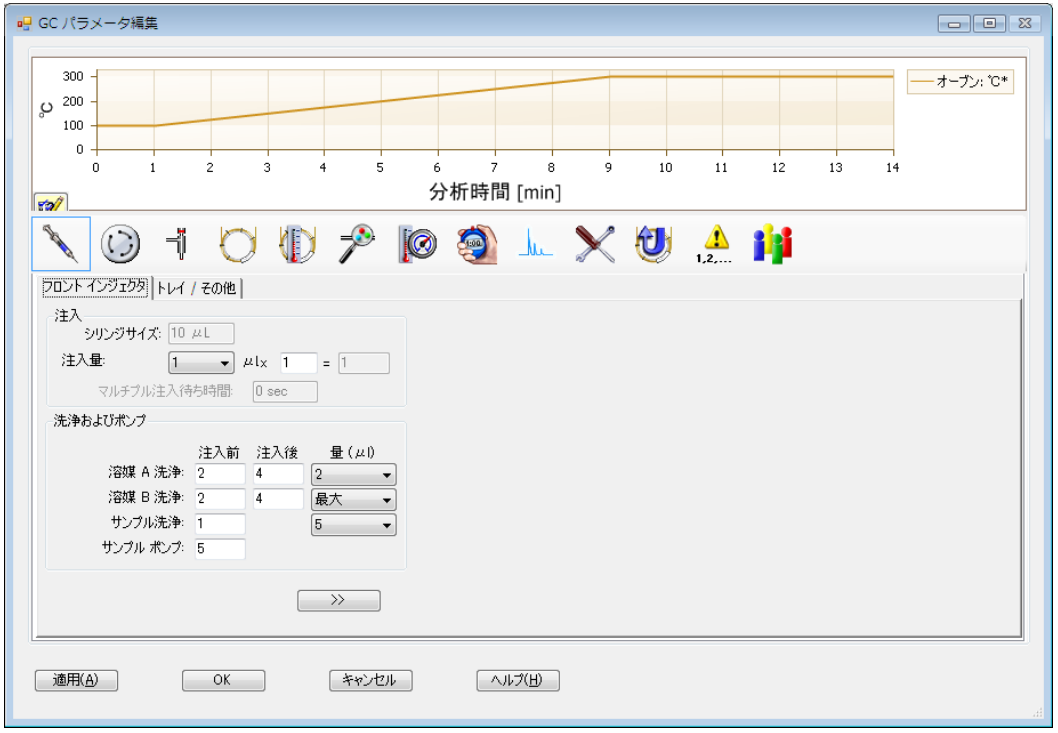


図 3　[GC パラメータ編集] ウィンドウ

表 1　データ測定メソッドの GC パラメータ

パラメータ	値
オーブン	
平衡時間	0.5 min
オーブンプログラム	**オーブン温度は** ON 、100 ℃**でホールド時間** 1 min、**次に** 25 ℃ /min **で** 300 ℃ **まで昇温し ホールド時間** 10 min
ランタイム	19 min
フロント SS 注入口	He
モード	**スプリットレス**
ヒーター	**On** 300 ℃

パラメータ	値
圧力	CFT で設定したカラム流量で自動的に設定される値
セプタムパージ流量	3 mL/min
ガスセーバー	20 mL/min ; 注入後 3 min
スプリットベント へのパージ流量	50 mL/min ; 開始時間 1 min
20 mL/min ; 注入後 3 min Aux 2 温度 {MSD トランスファライン }	
ヒーター	オン
温度	134 ℃
カラム # 1	HP-5MS 5% フェニルメチルサイロックス：325 ℃：30 m x 250 µm x 0.25 µm
イン	フロント SS 注入口 He
アウト	真空
（初期）	100 ℃
流量	1.2 mL/min
流量プログラム	オフ
フロントインジェクタ	
シリンジサイズ	10 µL
注入量	1 µL
溶媒 A 洗浄（注入前）	2
溶媒 A 洗浄（注入後）	4
溶媒 A 量	2 µL
溶媒 B 洗浄（注入前）	2
溶媒 B 洗浄（注入後）	4
溶媒 B 量	最大
サンプル洗浄	1
サンプル洗浄量	5 µL
サンプルポンプ	5
ドゥエルタイム（注入前）	0 min

パラメータ	値
ドゥエルタイム（注入後）	0 min
溶媒洗浄吸引速度	300 µL/min
溶媒洗浄排出速度	6000 µL/min
サンプル洗浄吸引速度	300 µL/min
サンプル洗浄排出速度	6000 µL/min
注入排出速度	6000 µL/min
粘性待ち時間	7 秒
サンプリング深さ	無効
コリジョンセル EPC モジュール	
窒素	オフ
ヘリウム	オフ

タスク 3. プリカーサイオンを検出するための測定メソッドの作成

この実習では、タスク 2 で行った GC パラメータを設定したメソッドを用いて、プリカーサイオンの 7000A スキャンパラメータを設定、メソッドに保存します。

ステップ	詳細説明	コメント
3 ベンゾジアゼピン混合液に適した MS パラメータを設定し、*iii*paul1_MS_Scan.M と名前を付けてメソッドを保存します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。	a [QQQ メソッドエディタ] アイコン（図 1 参照）をクリックします。 b [ソース温度] を 250 ℃に設定し、[電子エネルギー] を [チューン設定] に、[溶媒待ち時間] を 4 分に、[検出器設定] を [デルタ EMV] に設定します。 c [タイムフィルタリング] のピーク幅 を 0.7 秒に設定します。 d [タイムセグメント] セクションで、開始時間に 3.0 を入力し、[スキャンタイプ] にドロップダウンリストから [MS1Scan] を選択します。[デルタ EMV] に 0 を入力し、[保存済みデータ] のチェックボックスをオンにします。 e [スキャンセグメント] セクションで、[セグメント名] に「スキャン」、[開始質量] に 50、[終了質量] に 450、[スキャン時間] に 500 を入力します。 f [スキャンパラメータ] セクションで、[ステップサイズ] に 0.1 amu、[スレッショルド] に 100 を入力します。 g [OK] をクリックしてウィンドウを閉じます。 h メインウィンドウから [メソッド] > [名前を付けてメソッドを保存] を選択して、*iii*paul1_MS_Scan.M と名前を付けてメソッドを保存します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。	• 図 4 [QQQ メソッドエディタ] ウィンドウが表示されます。 • 7000A が、[溶媒待ち時間] 設定により、7000A は 4 分後からデータ取り込みを開始します。

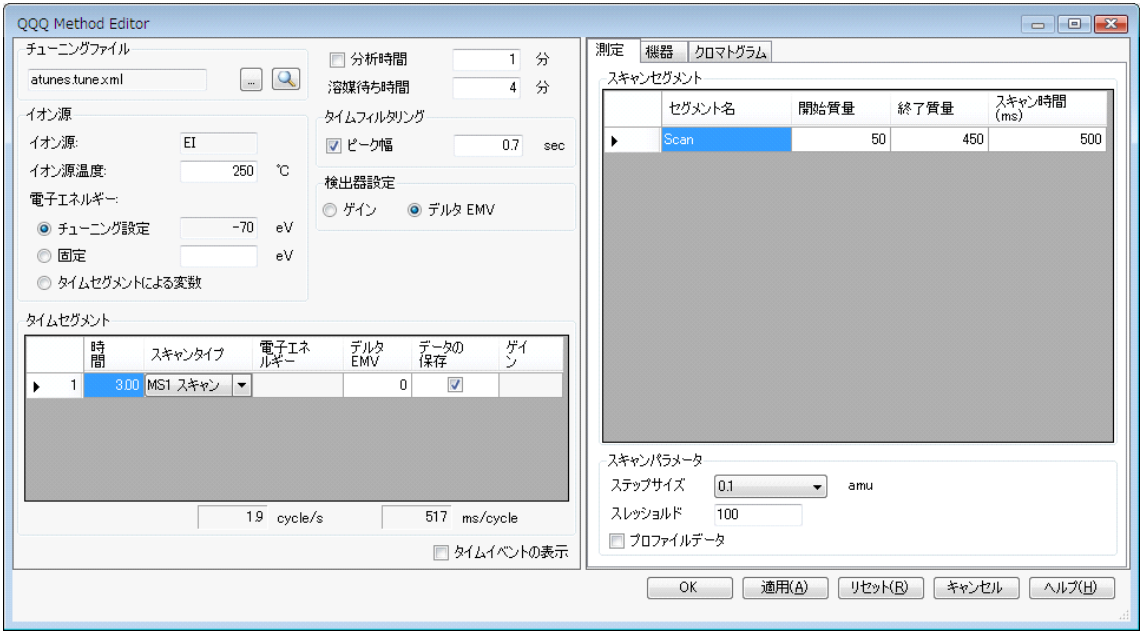


図 4　QQQ メソッドエディタ

タスク 4. プリカーサイオンのスキャンデータの測定（オプション）

このタスクでは、前のタスクで開発したメソッドを使用して、スキャンデータを取り込みます。プログラム付属のデモデータファイルを用いて次のタスクを行えるため、このタスクはオプションです。このタスクで説明するとおりに実行して、独自のデータファイルを作成することもできます。

ステップ	詳細説明	コメント
4 データを取り込みます（オプション）。 • データファイルに *iii*first_trial3_scan.D と名前を付けます。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。 • データファイルとメソッドを保管するディレクトリパスを指定します。	a [分析開始]（緑の矢印）アイコンをクリックします。 b [データパス] にこの分析で測定するデータファイルを保存するディレクトリを入力します。 c [フロント注入口] セクションで、[データファイル名] に *iii*first_trial3_scan.D と入力します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。 d [バイアル番号] にオートサンプラトレイのロケーション番号を入力します。 e [メソッド実行範囲] セクションで、[データ測定] を選択します。 f [OK & メソッド実行] ボタンをクリックします。	• 図 5 [測定開始] ダイアログボックスが表示されます。 • メソッドが GC および 7000A に送信されます。機器の準備ができると、サンプルが注入されてデータが取り込まれ、指定されたデータディレクトリに保存されます。

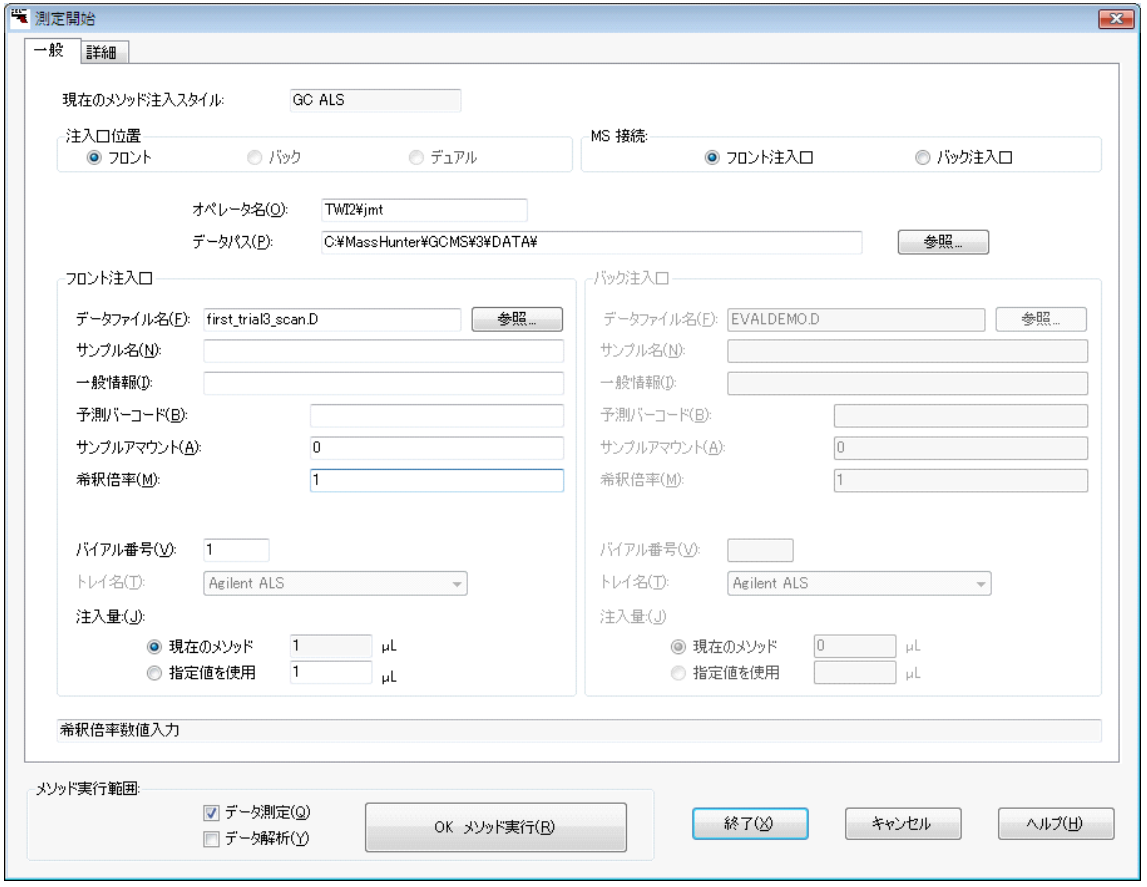


図 5　[測定開始] ダイアログボックス

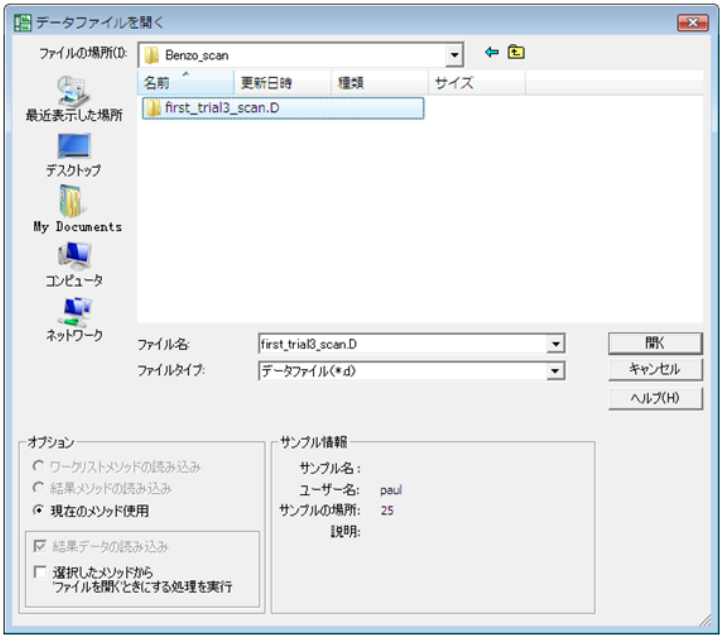
タスク 5. プリカーサイオン質量の決定

この実習では、測定したデータファイルの各化合物のプリカーサイオンを決定します。

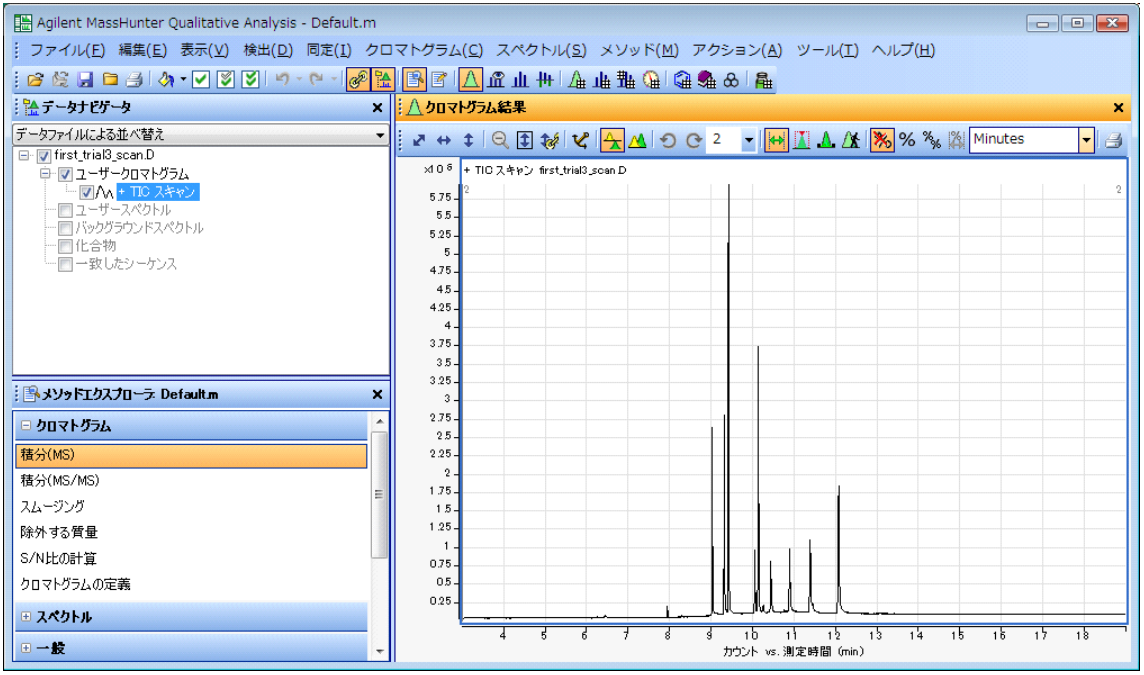
ステップ	詳細説明	コメント
5 測定したデータファイルを開きます。 • 定性分析プログラムで、デモデータファイル **first_trial3_scan.D** または 5 ページの「タスク 1. 注入口と注入パラメータの設定」で作成したデータファイルのいずれかを開きます。	a [定性分析] アイコンをダブルクリックします。 プログラムに [データファイルを開く] ダイアログボックスが表示されます。	• データファイルを開いたとき、結果データが保存されていない場合は、[結果データの読み込み]（左下隅）チェックボックスが灰色表示されます。チェックボックスがオンになっている場合、データファイルには既に結果が含まれていることを意味します。ファイルを開く前に、このチェックボックスをオフにします。

始める前に、以前の設定すべてがデフォルト値に戻っているかを確認します。

- デフォルトレイアウトの復元
  - [表示] > [ウィンドウレイアウト] > [デフォルトレイアウトの復元] をクリックします。
- メソッドが **default.m** であることを確認します（タイトルバーを参照）。
  - [メソッド] > [開く] をクリックします。
  - **default.m** を選択し、[開く] をクリックします。
- 表示オプションをデフォルト設定に戻します。
  - [ツール] > [プロット表示オプション] をクリックします。
  - [デフォルト]、[OK] の順にクリックします。



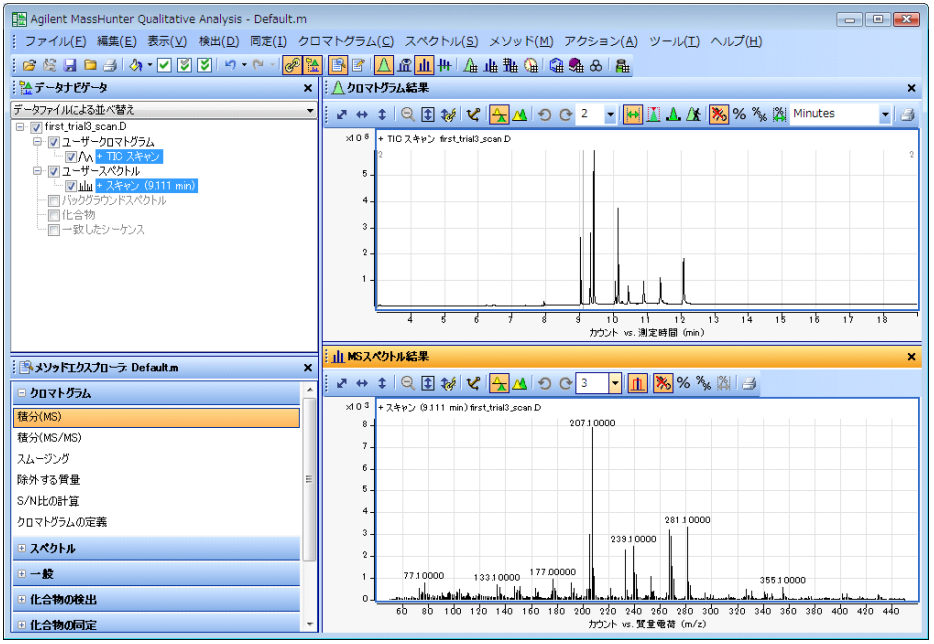
ステップ	詳細説明	コメント
	b 以下の操作いずれかを行います。 • デモデータファイル **first_trial3_scan.D** を選択して、[開く] をクリックします。 • 13 ページの「タスク 4. プリカーサイオンのスキャンデータの測定（オプション）」で作成したデータファイルを選択し、[開く] をクリックします。 デフォルトでは、画面上に [トータルイオンクロマトグラム]（TIC）が表示されます。	• 下図にデフォルトレイアウトを示します。 • 定性分析プログラムでは、新たにデータファイルを開くときに、以前の解析で使用していたのと同じレイアウトと表示設定が引き継がれます。そのため、この実習では必ずデフォルト設定に戻ってください。



ステップ	詳細説明	コメント

• 8 つのピークすべてのプリカーサイオン質量を特定します。
  • 値がこの表に示した値と同様であれば、正確に測定したことになります。
  • プリカーサイオン質量を特定した後、データファイルを閉じます。
	c [クロマトグラム結果] ウィンドウで、ツールバーの [範囲選択] アイコン を選択します。
	d マウスの左ボタンをクリックし、9 分あたりにある最初のピーク全体に対してドラッグし影の付いた範囲を作ります。
	e 影の付いた範囲内で右クリックし、ショートカットメニューから [MS スペクトルの抽出] を選択します。
	f 他の化合物に対して、ステップ d ～ステップ e を繰り返します。プリカーサイオンの質量はステップ 2 の表に記載の値と一致するはずです。
	g [ファイル] > [データファイルを閉じる] をクリックします。
	h 結果を保存するか聞かれた場合は、[いいえ] をクリックします。
		• ハイライトさ れた領域にあるピークの平均化されたスペクトルが、[MS スペクトル結果] ウィンドウに表示されます。
		• 最初の化合物である Oxazepam のプリカーサイオンは m/z 239.1 と測定されます。

ピーク	化合物	RT	m/z
1	Oxazepam	9.0	239.1
2	Lorazepam	9.3	274.1
3	Diazepam	9.4	283.2
4	Temzepam	10.0	271.1
5	Flunitrazepam	10.1	312.2
6	Nitrazepam	10.9	253.1
7	Clonazepam	11.4	314.1
8	Alprazelam	12.1	308.2



タスク 6. プロダクトイオン質量を検出するための測定メソッドの作成

この部分のメソッド開発では、4 パターンの衝突エネルギーを使用して、MRM(Multiple Reaction Monitoring）に使用する最適なプロダクトイオンを決定します。11 ページの「タスク 3. プリカーサイオンを検出するための測定メソッドの作成」で保存したメソッドの、7000A の部分を変更して、以前に同定したプリカーサイオンを開裂させ、4 パターンの異なる衝突エネルギーでプロダクトイオンをスキャンします。

ステップ	詳細説明	コメント
6 Oxazepam のプロダクトイオンの検出に適した MS パラメータを入力し、***iii*paul1_Oxazepam_prod_ion_Scan 2.M** と名前を付けてメソッドを保存します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。 前のタスクのデータを使用して、その他の 7 つの化合物に追加メソッドを作成します。	**a** データ測定ワークステーションから、***iii*paul1_MS_Scan.M** メソッドを開きます。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。[**QQQ メソッドエディタ**] アイコンをクリックします。 **b** [タイムセグメント] セクションで、開始時間に 3.0 を入力し、[スキャンタイプ] のドロップダウンリストからプロダクトイオン を選択し、[デルタ **EMV**] に 650 を入力し、[保存済みデータ] チェックボックスをオンにします。 **c** [スキャンセグメント] セクションで、[セグメント名] に「**Oxazepam**」、[プリカーサイオン] に 239.1、[**MS2 質量範囲 (Low)**] に 50、[**MS2 質量範囲 (High)**] に 275、[スキャン時間（**ms**）] に 300、[衝突エネルギー] に 5 を入力します。 **d** [**MS1 分解能**] を [**Wide**] に設定します。 **e** [スキャンパラメータ] セクションで、[ステップサイズ] に 0.1 amu を入力し、[プロファイルデータ] を選択します。 **f** [スキャンセグメント] セクションで、セルの上で右クリックし、コンテキストメニューから [新しいスキャンセグメント] を選択します。 **g** 上のステップ g を 3 回繰り返します。	• このメソッドはタスク 3 で保存されたもので、化合物の分離に最適な GC 測定パラ メータが設定されています。 • [**QQQ メソッドエディタ**] ウィンドウが開きます。 • 最初のスキャンセグメントのすべての値を持つ新しいスキャンセグメントが作成されます。 • 7000A では最大 4 つのスキャンセグメントがサポートされます。

ステップ	詳細説明	コメント
	h 2 番目のスキャンセグメントでは、[衝突エネルギー] を 15 に変更します。 i 3 番目のスキャンセグメントでは、[衝突エネルギー] を 25 に変更します。 j 4 番目のスキャンセグメントでは、[衝突エネルギー] を 35 に変更します。 k [OK] をクリックしてウィンドウを閉じます。 l メインウィンドウから [メソッド] > [名前を付けてメソッドを保存] を選択して、*iii*paul1_Oxazepam_prod_ion_Scan2.M と名前を付けてメソッドを保存します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。 m [QQQ メソッドエディタ] アイコンをクリックします。	• プロダクトイオンの感度と選択性を最適化するために、衝突エネルギーがそれぞれ異なる、合計 4 つのスキャンセグメントを設定します。
	n 表 2 に示されている各化合物について、上の ステップを繰り返して、新しいメ ソッドを作成します。各メソッドの名前は、化合物名部分を表 2 のそれぞれの名前に置き換えて保存してください。	• 化合物固有の 8 つのメソッドが作成されます。

表 2　プロダクトイオンの検出に必要なメソッドおよび変更された値

メソッド	セグメント名	プリカーサイオン	MS2 質量範囲 (Low)	MS2 質量範囲 (High)	スキャン時間	衝突エネルギー
*iii*paul1_Oxazepam_prod_ion_Scan2.M	Oxazepam	239.1	50	275	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_Lorazepam_prod_ion_Scan1.M	Lorazepam	274.1	50	280	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_diazepam_prod_ion_Scan1.M	Diazepam	283.1	50	290	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_flunitrazepam_prod_ion_Scan1.M	Flunitrazepam	312.2	50	315	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_temzepam_prod_ion_Scan1.M	Temzepam	271.1	50	280	300	5, 15, 25, 35

表 2　プロダクトイオンの検出に必要なメソッドおよび変更された値

メソッド	セグメント名	プリカーサイオン	MS2 質量範囲 (Low)	MS2 質量範囲 (High)	スキャン時間	衝突エネルギー
*iii*paul1_nitrazepam_prod_ion_Scan1.M	Nitrazepam	253.1	50	270	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_clonazepam_prod_ion_Scan1.M	Clonazepam	314.1	50	320	300	5, 15, 25, 35
*iii*paul1_alprazelam_prod_ion_Scan1.M	Alprazelam	308.2	50	320	300	5, 15, 25, 35

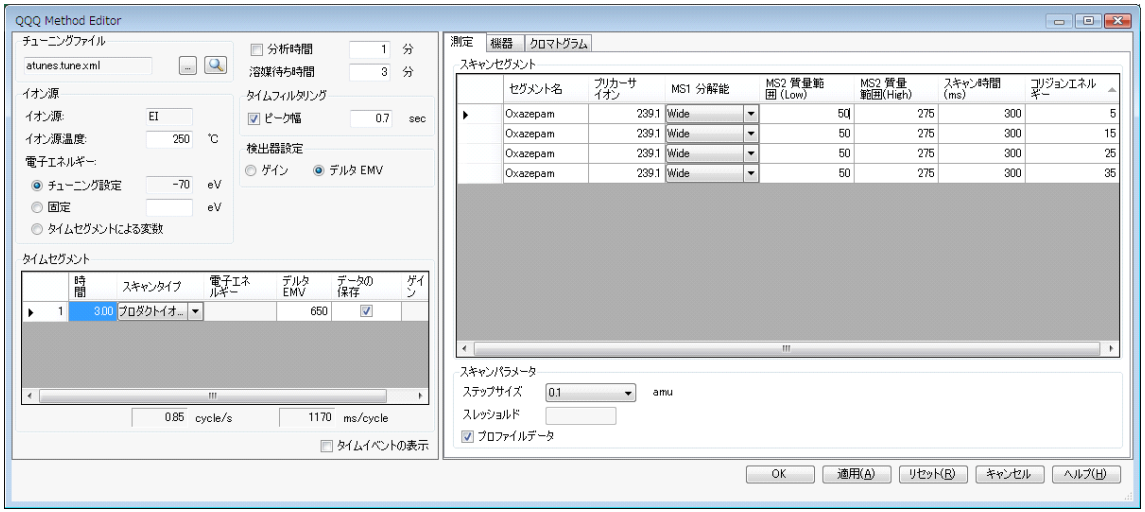


図 6　プロダクトイオンを検出するための Oxazepam の 7000A 測定メソッド

タスク 7. プロダクトイオンを検出するためスキャンデータの測定（オプション）

このタスクでは、前のタスクで開発した化合物固有の 8 つのメソッドを使用して、ベンゾジアゼピン化合物のプロダクトイオンを検出するデータを取り込むためのシーケンスを作成します。

ステップ	詳細説明	コメント
7 シーケンスの設定と実行（オプション） • データファイルに *iiixx*_prod_ion_scan1.d と名前を付けます。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルで、*xx* は化合物名です。	a [シーケンスの編集] アイコンをクリックして、[シーケンステーブル] を表示します。 b [シーケンステーブル] ツールバーにある [新しいサンプル] ボタンの横にあるドロップダウンリストを使用して、[5 サンプル] を選択します。 c 下の図 7 に示されているように、各サンプルにサンプルの名前 ALS バイアルロケーション番号、メソッドファイル名、およびデータファイル名を入力します。 d ツールバーの [下へコピー] ドロップダウンリストを使用して、タイプ列のサンプルおよび希釈列の値をすべてのサンプルにコピーします。 e [OK] ボタンをクリックします。 f [シーケンス] > [名前を付けてシーケンスを保存] を選択し、BenzoPI.Sequence.xml という名前でシーケンスを保存します。 g 8 本のサンプルバイアルを ALS トレイの指定された場所に入れます。 h [シーケンスの実行] アイコンをクリックして、[シーケンス開始] ダイアログボックスを表示します。 i 必要に応じて、シーケンスのコメントを追加し、データファイルディレクトリを変更して、[シーケンス実行] ボタンをクリックします。	• 6 つのデモデータファイルが用意されているので、このステップはオプションです。 • これで、テーブルのサンプル行が 8 行になります。

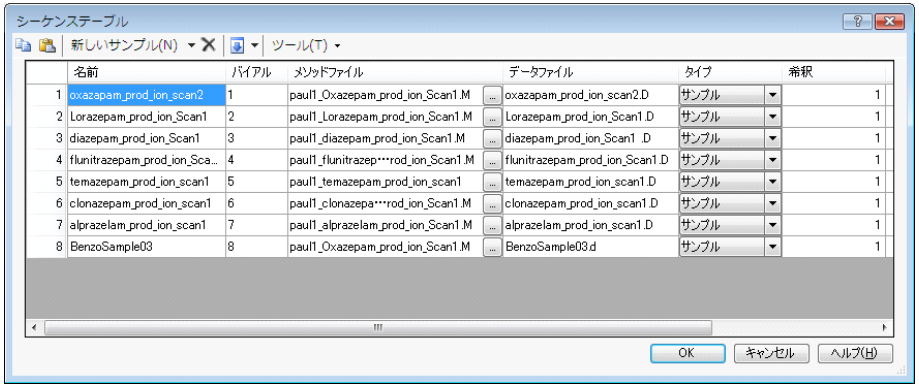


図 7　シーケンステーブルの値

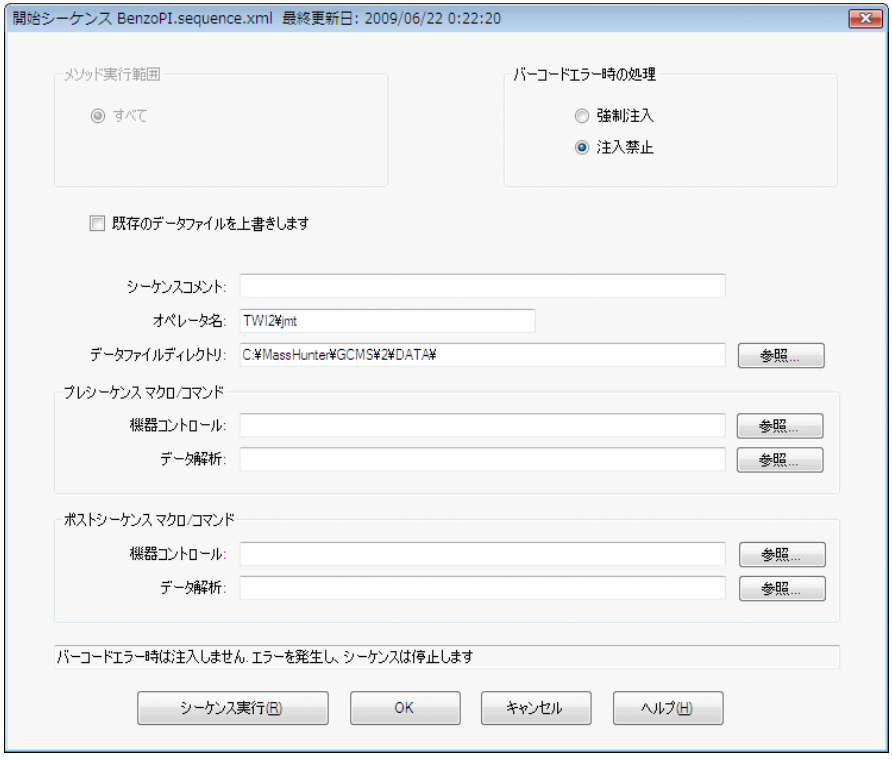


図 8　[シーケンス開始] ダイアログボックス

タスク 8. プロダクトイオンの決定

この実習では、測定データファイル中で指定した各化合物のプロダクトイオンを決定します。

ステップ	詳細説明	コメント
8 定性分析プログラムで測定データファイルを開きます。	a [定性分析] アイコンをダブルクリックします。 プログラムに [データファイルを開く] ダイアログボックスが表示されます。	• データファイルを開いたとき、結果データが保存されていない場合は、[結果データの読み込み]（左下隅）チェックボックスが灰色表示されます。チェックボックスがオンになっている場合、データファイルには既に結果が含まれていることを意味します。ファイルを開く前に、このチェックボックスをオフにします。
	b 以下の操作いずれかを行います。 • 8 つのデモデータファイルを選択して、[開く] をクリックします。 • 21 ページの「タスク 7. プロダクトイオンを検出するためスキャンデータの測定（オプション）」で取り込んだデータファイルをすべて選択し、[開く] をクリックします。	• CTRL キーを使用すると、複数のデータファイルが選択できます。
	c [データナビゲータ] で、Oxazepam を除くすべての化合物のチェックボックスをオフにします。	• 同時に表示できる測定ファイルは 1 つのみです。
	d [MS スペクトル結果] ウィンドウツールバーで、ドロップダウンメニューから 5 を入力します。	• 最大 5 つのスペクトルペインが表示できます。

ステップ	詳細説明	コメント
	e [クロマトグラム結果] ウィンドウで、ツールバーの [範囲選択] アイコン を選択します。	
	f マウスの左ボタンをクリックし、この化合物の RT に対応する突出したピークを横切るようにカーソルをドラッグし、影の付いた範囲を作ります。	• Oxazepam では、9 分あたりにあるピークがこれにあたります。
	g 影の付いた範囲内で右クリックし、ショートカットメニューから [MS スペクトルの抽出] を選択します。このピークのスペクトルは、図 9 に表示されています。	• 測定メソッドの 4 つの衝突エネルギーのスキャンセグメントについて、ハイライトされた領域にあるピークの平均化されたスペクトルが、[MS スペクトル結果] ウィンドウに表示されます。

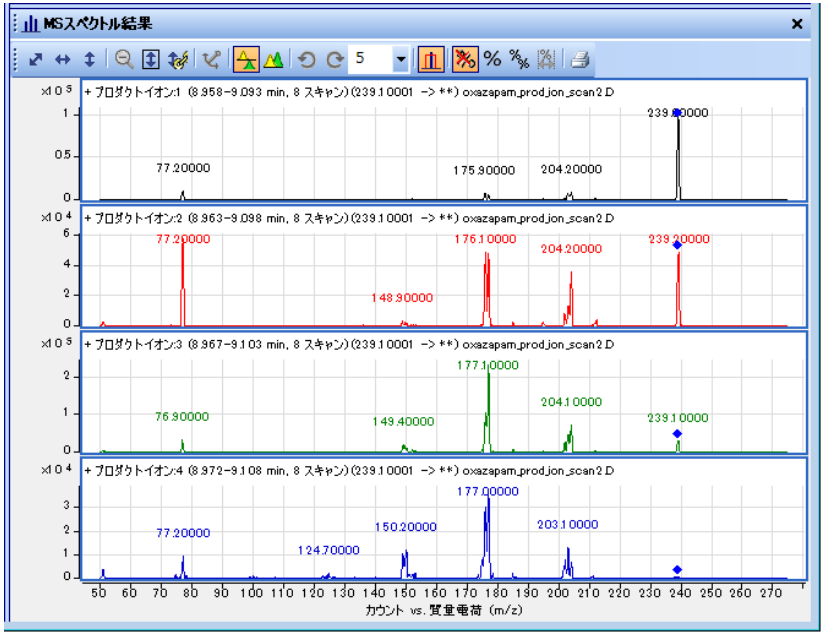


図 9　プロダクトイオンの 4 つの衝突エネルギーに対する抽出スペクトル

ステップ	詳細説明	コメント
• 8 つのピークすべてに対してプロダクトイオンを決定します。 • 値が表 3 に示した値と同様であれば、正確に測定されています。 • プリカーサイオン質量を決定した後、データファイルを閉じます。	**h** 最初の化合物である **Oxazepam** のプロダクトイオンは、CID 25、m/z 177.1 と測定されます。 **i** [データナビゲータ] で現在のデータファイルのチェックボックスをオフにします。 **j** 次のデータファイルのチェックボックスをオンにします。 **k** 他の化合物に対して、ステップ f ～ ステップ j を繰り返します。プロダクトイオン質量が、表 3 と一致していることを確認してください。 **l** [ファイル] > [データファイルを閉じる] をクリックします。 **m** 結果を保存するか聞かれた場合は、[いいえ] をクリックします。グボックスが表示されます。	• 各スペクトルを調べ、最も選択的なイオンを探します。プリカーサイオンに最も近く、隣接するイオンからの干渉が最も少ない、最も高い質量のカウントを探してください。 ここでは、他のスペクトルの他のイオンの最大カウントが 25 であるのに対し、ベストな選択のイオンはカウントが 100 になっています。

表 3　ベンゾジアゼピン化合物で検出されたプロダクトイオン

化合物	データファイル	プリカーサイオン	プロダクトイオン	衝突エネルギー
Oxazepam	Oxazepam_prod_ion_scan2.d	239.1	**177.1**	25
Lorazepam	Lorazepam_prod_ion_scan1.d	274.1	**239.1**	15
Diazepam	Diazepam_prod_ion_scan1.d	283.1	**238.1**	25
Flunitrazepam	Flunitrazepam_prod_ion_scan1.d	312.2	**266.1**	25
Temzepam	Temazepam_prod_ion_scan1.d	274.1	**77.1**	35
Nitrazepam	Nitrazepam_prod_ion_scan1.d	253.1	**152.1**	25
Clonazepam	Clonazepam_prod_ion_scan1.d	314.1	**268.2**	25
Alprazelam	Alprazolam_prod_ion_scan1.d	308.2	**279.2**	15

タスク 9. MRM メソッドの作成

この実習では、サンプルに存在するベンゼン化合物を検出する MRM メソッドを作成します。

ステップ	詳細説明	コメント
9 データ測定プログラムを開き、25 ページの表 3 のデータを使用して、MRM メソッドを作成します。	**a** データ測定ワークステーションから、*iii*paul1_MS_Scan.M メソッドを開きます。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。 **b** [QQQ メソッドエディタ] アイコンをクリックします。 **c** [タイムセグメント] セクションで、開始時間に 3.0 を入力し、スキャンタイプのドロップダウンリストから MRM を選択して、[デルタ EMV] に 650 を入力し、[保存済みデータ] チェックボックスをオンにします。 **d** [スキャンセグメント] セクションで、[MS1 分解能] および [MS2 分解能] を [Wide] に、[ドゥエル] に [50] を入力します。 **e** [スキャンセグメント] セクションで、セルの上で右クリックし、コンテキストメニューから [新しいスキャンセグメント] を選択します。 **f** 上のステップを 7 回繰り返します。 **g** 27 ページの図 10 と一致するように、[スキャンセグメント] セクションの残りの部分を記入します。 **h** [OK] をクリックしてウィンドウを閉じます。 **i** メインウィンドウから [メソッド] > [名前を付けてメソッドを保存] を選択して、*iii*paul1_benzo_mrm_1.M と名前を付けてメソッドを保存します。ここで、*iii* はユーザーのイニシャルです。	• このメソッドの GC 測定パラメータは変更せずに使用してください。7000A メソッドパラメータを、この手順で編集して、MRM メソッドを作成します。

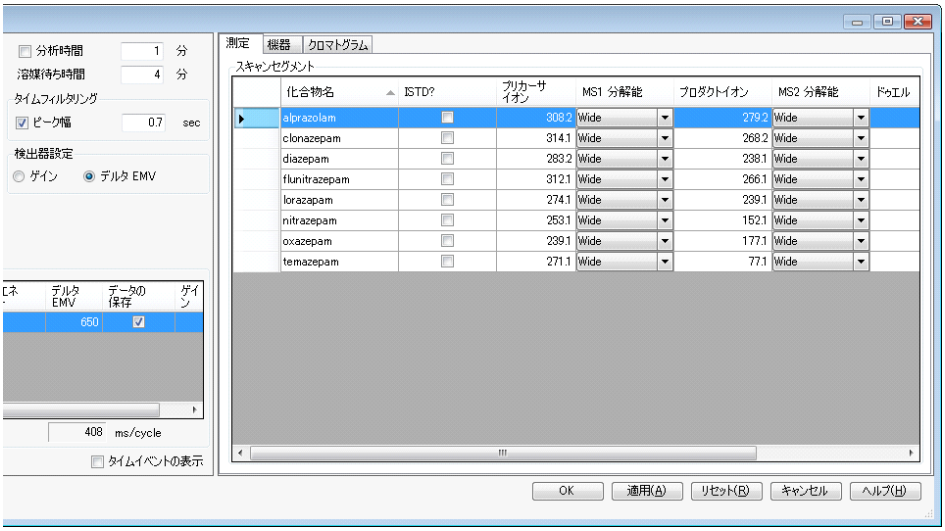


図 10　MRM メソッドの [スキャン] セクション

実習 – 定量分析メソッドの作成

タスク 10. MRM データの測定（オプション）

この実習では、キャリブレー ションデータを測定するシーケンスを作成します、このデータはベンゼン化合物を含むサンプルの MRM 定性分析に使用します。未知サンプルの定量を説明するための 3 種類の濃度のベンゼン化合物サンプルが準備されています。デモデータファイルは、プログラムディスクに収録されているので、ベンゼンキャリブレーションサンプルのデータ測定の実習はオプションです。

ステップ	詳細説明	コメント
10 データ測定プログラムを開き、前回のタスクで作成した MRM メソッドを使用して、キャリブレーションデータを取り込みます。このデータは、定性分析プログラムで定量分析メソッドを作成するために必要です。	**a** データ測定ワークステーションから、*iii*paul1_benzo_mrm_1.M メソッドを読み込みます。 **b** [シーケンスの編集] アイコンをクリックして、[シーケンステーブル] を表示します。 **c** サンプルのエントリを [追加] または [削除] して、[シーケンステーブル] のサンプル行を 5 行にします。 **d** 最初のサンプルの [名前] に [**BenzoLevel1**] を入力、[バイアル] に ALS バイアルロケーションを入力、[メソッドファイル] に [**Benzo_MRM.M**] を選択、[データファイル] に [**paul1_benzo_L1_19Nov08.D**] を入力、[タイプ] のドロップダウンリストから [**Cal**] を選択、[レベル] に [**L1**] を入力、[希釈] に [**1**] を入力します。30 ページの図 11 を参照してください。 **e** [シーケンステーブル] ツールバーの [下へコピー（連続データ）] ドロップダウンを使用して、最初の行で指定しているサンプル値の [名前]、[バイアル]、[レベル] をその下の 4 行に連続した値でコピーします。 **f** [シーケンステーブル] ツールバーの [下へコピー] ドロップダウンを使用して、最初の行で指定しているサンプル値の [メソッドファイル]、[データファイル]、[タイプ]、[希釈] をその下の 4 行にコピーします。 **g** 30 ページの図 11 に示されたパターンに従って、[データファイル] 名の「_L1_」の部分を変更します。 **h** サンプルテーブルに行を 3 行追加し、完成した表が 30 ページの図 11 のようになるように、これらのサンプルに値を記入します。	• このメソッドは、26 ページの「タスク 9. MRM メソッドの作成」で作成しました。 • 連続したサンプルエントリを削除するには、削除する最初のサンプルの左側のサンプル番号列をクリックし、**Shift** キーを押したまま、テーブルの最後のサンプル番号列をクリックします。削除するサンプルがハイライトされた状態で、コンピュータの **Delete** キーを押します。 • バイアルロケーションをこのように増加させた場合、バイアルがサンプラトレイの連続した場所に置いてください。

ステップ	詳細説明	コメント
	i [OK] をクリックしてウィンドウを閉じます。 j [シーケンス] > [名前を付けてシーケンスを保存] を選択し、BenzoCalibration.Sequence.xml という名前でシーケンスを保存します。 k 既知の濃度が入っている 5 本のサンプルバイアルと未知の濃度が入っている 3 本のサンプルを ALS トレイの指定された場所に置きます。 l [シーケンスの実行] アイコンをクリックして、[シーケンス開始] ダイアログボックスを表示します。 m 必要に応じて、シーケンスの [コメント] を追加し、[データファイルディレクトリ] を変更して、[シーケンス実行] ボタンをクリックします。	• 残りのステップは任意です。これらのサンプルバイアルは、3 ページの「データ取り込みに必要なサンプルの準備」で準備します。

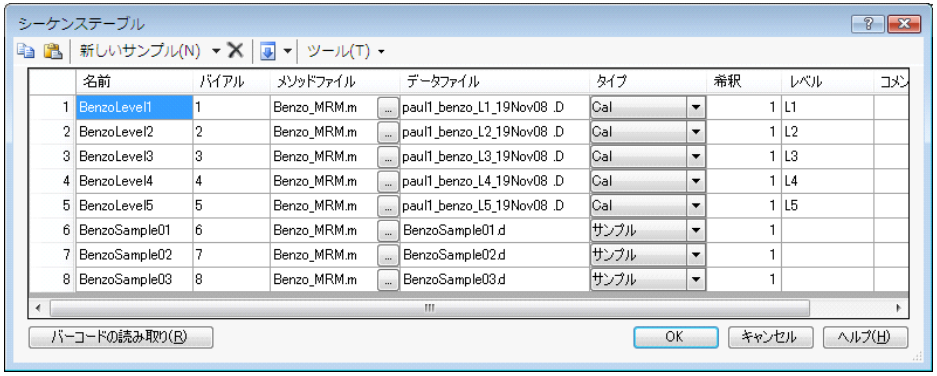


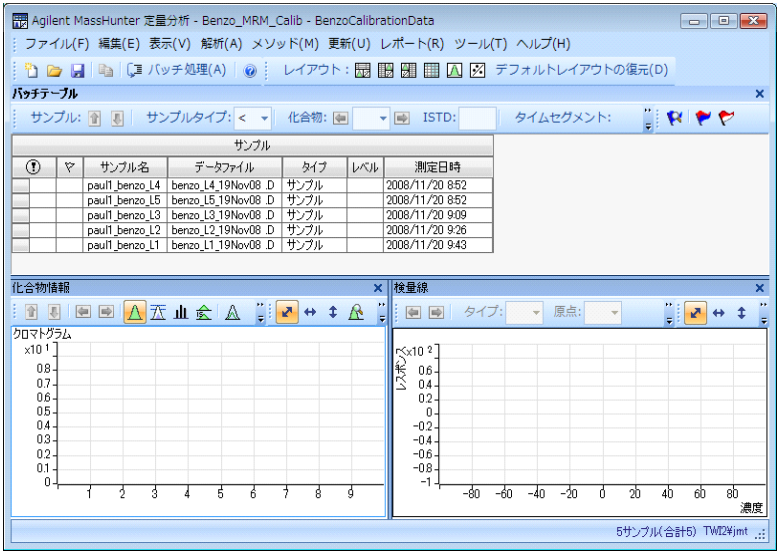
図 11　ベンゼンキャリブレーションサンプルおよび未知サンプルのシーケンス

タスク 11. 定量分析バッチの作成

この実習では、前のタスクで測定した 5 つのキャリブレーションサンプルの測定データを使用して、定量メソッドの作成に使用するバッチを作成します。

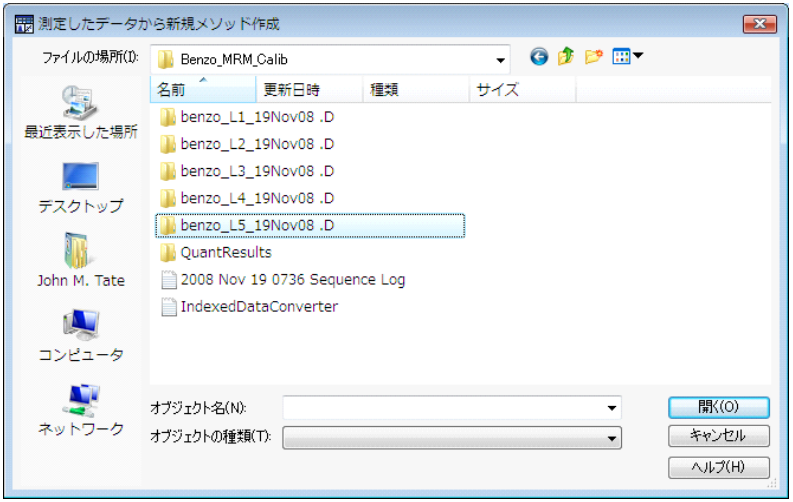
ステップ	詳細説明	コメント
11 定量分析プログラムを開き、データを分析するバッチを作成します。 バッチに名前を付け、バッチディレクトリを割り当てます。	a Windows デスクトップの [QQQ 定量分析] アイコンをダブルクリックします。	• 定量分析ワークステーションが開きます。
	b メインメニューから、[ファイル] > [新規バッチ] を選択、ファイルの場所のドロップダウンリストを使用して、5 つのキャリブレーションファイルが保存されているフォルダに移動し、バッチ名 **BenzoCalibrationData** を入力して、[開く] ボタンをクリックします。	• これは、28 ページの「タスク 10. MRM データの測定（オプション）」でデータファイルに選択したディレクトリです。このデータ測定タスクを省略した場合は、プログラムディスクに収録されている 5 つのサンプルデータファイルで代用できます。サンプルデータファイルをこのディレクトリにコピーしてください。
• バッチにサンプルを追加します。	c メインメニューから、[ファイル] > [サンプルの追加] を選択し、**paul1_benzo_L1_19Nov08.D** から **paul1_benzo_L5_19Nov08.D** までの 5 つのデータファイルを選択します。 	• データ解析の検量線を作成するには 5 つのキャリブレーションファイルが必要で、このうち 1 つを使用して、メソッドに MRM データを抽出します。 • 5 つのサンプルの [タイプ] はすべて [**Cal**] で、[レベル] は [**L1**] から [**L5**] です。[タイプ] および [レベル] は、30 ページの図 11 シーケンス測定で設定されたものです。

ステップ	詳細説明	コメント
	d [OK] ボタンをクリックします。これで、バッチテーブルに 5 つのサンプルが含まれます。 e 必要に応じて、[タイプ] を [Cal] に変更し、[名前] 列で並び替えを行い、[レベル] 列に表示されている値を入力します。 f 必要に応じて、[希釈] および [アマウント] 列をバッチテーブルのサンプルセクションに追加します。値「1」をすべてのこれらの列のすべての [希釈] および [アマウント] に入力します。	• バッチには、サンプルを自動的に解析するためにデータ解析メソッドが必要です。



タスク 12. MRM 定量分析メソッドの作成

ステップ	詳細説明	コメント
12 データ解析メソッドを作成します。	a メインメニューから、[メソッド] > [新規] > [MRM データから新規作成] の順に選択し、[測定したデータから新規メソッド作成] ダイアログボックスを表示します。 b [ファイルの場所] ドロップダウンリストを使用して、バッチディレクトリを選択し、**paul1_benzo_L5_19Nov08.D** データファイルをクリックして、[開く] ボタンをクリックします。	• 26 ページの「タスク 9. MRM メソッドの作成」で作成した測定メソッドに保存されたサンプルデータを使用して、データ解析メソッドの部分が自動的に記入されます。 • このサンプルデータファイルから、データ解析メソッドの大部分はプログラムによって自動に作成されますが、その後、メソッドエディタを使用して手動でメソッドのデータ解析部分を変更できます。



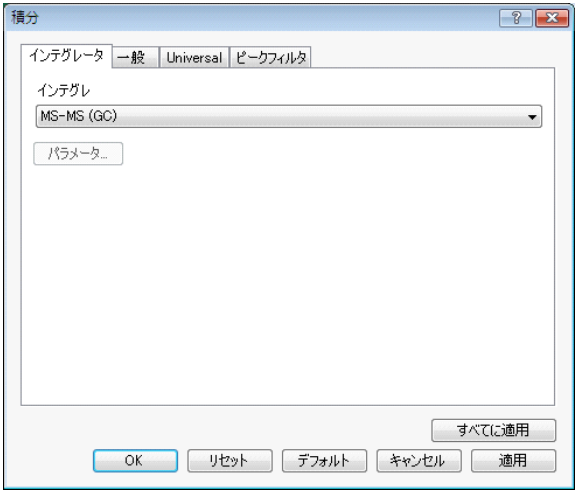
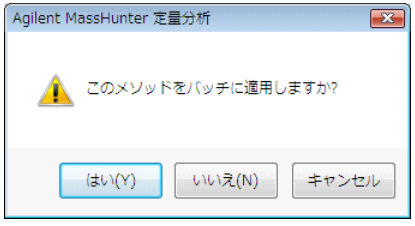
ステップ	詳細説明	コメント
	c [メソッドタスク] ペインで、[メソッド設定タスク]、[MRM 化合物設定] の順にクリックし、[メソッドテーブル] を表示します。	• 測定メソッドに最初から含まれていた 8 つの化合物が表示されます。

ステップ	詳細説明	コメント
• キャリブレーションテーブルを作成します。	d [メソッドタスク] ペインで、[メソッド設定タスク]、[濃度の設定] の順にクリックします。 e テーブルの最初の化合物の [希釈最高濃度] 列に 1000.0 を入力し、[希釈パターン] 列のドロップダウンリストから [1:2] を選択します。	• 濃度を入力できるように、[メソッドテーブル] 列が変化します。 • キャリブレーションサンプルの最高濃度、キャリブレーションレベルの数、および希釈パターンを使用して、その他のレベルも自動的に計算されます。

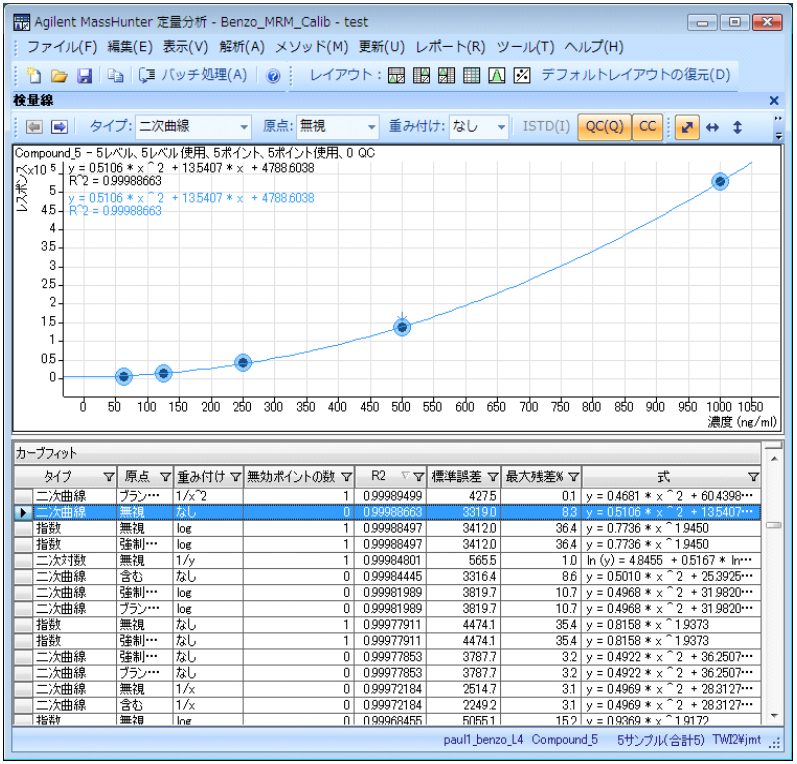
ステップ	詳細説明	コメント
	f [メソッドテーブル] ツールバーで、[レベル名プレフィクス] に L を、[レベル数] に 5 を入力し、[レベルの作成] ボタンをクリックします。	• 5 つのキャリブレーションレベルのそれぞれについて濃度が記入されたキャリブレーションテーブルが、メソッドテーブルの最初の化合物の下に表示されます。

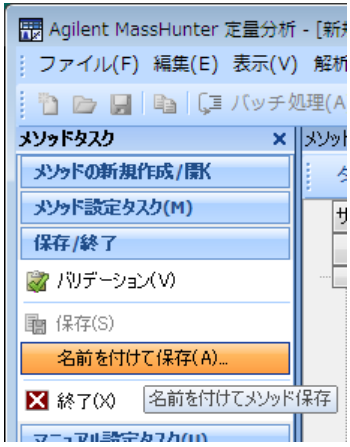
ステップ	詳細説明	コメント
• キャリブレーションテーブルを他の定量対象化合物にコピーします。	g [定量対象化合物テーブル] で最初の化合物を選択して、化合物を右クリックし、ショートカットメニューから [キャリブレーションレベルのコピー] を選択します。	• [キャリブレーションレベルのコピー] ダイアログボックスが表示されます。これを使用して、現在の化合物から選択した化合物またはすべての化合物にキャリブレーションテーブルコピーします。
	h ダイアログボックスのすべての化合物を選択するには、[すべて選択] ボタンをクリックして、[OK] ボタンをクリックします。	• キャリブレーションテーブルが 8 つの化合物すべての定量対象化合物テーブルにコピーされます。

ステップ	詳細説明	コメント
• 検量線を設定します	i [メソッドタスク] ペインで、[メソッド設定タスク]、[検量線の設定] の順にクリックします。 j 定量対象化合物テーブルで、最初の化合物の [CF] 列で、ドロップダウンリストから [二次曲線] を選択します。このセルが選択された状態で、右クリックしてショートカットメニューから [下へコピー] を選択します。	• [メソッドテーブル] が表示され、[CF]、[検量線原点]、および [検量線重み付け] 列がハイライトされています。 • この例のベンゼン化合物は、[CF] が [二次曲線]、[検量線原点] が [無視]、[検量線重み付け] が [なし] に設定されています。

ステップ	詳細説明	コメント
• 積分を選択します。	k [メソッドタスク] ペインで、[詳細タスク]、[積分パラメータの設定] の順にクリックします。 l [メソッドテーブル] ペインで、任意の [定量対象化合物] で、[積分] 列エントリをクリックして、[積分] ダイアログボックスを表示し、[積分] ドロップダウンリストから [MS-MS（GC）] を選択します。	• MassHunter では、複数の積分方式（インテグレータ）を選択できます。 • GC の MRM データに最適な MS-MS（GC）積分を使用します。これは、パラメータのない積分方式（インテグレータ）です。
		
	m [すべてに適用] ボタンをクリックして、すべてのクォンティファイアピークの [積分] をこの値に設定します。 n [OK] をクリックしてこのダイアログボックスを閉じます。	• この積分は、すべてのピークの積分に使用されます。
• メソッドエディタを終了し、メソッドを保存します。	o [メソッドタスク] ペインで、[保存 / 終了]、[終了] の順にクリックします。	
		

ステップ	詳細説明	コメント
• データ解析メソッドをバッチに適用します。	p [はい] ボタンをクリックします。 q [バッチ処理] ボタンをクリックし、バッチにあるすべてのサンプルを定量します。	• このメソッドは、[バッチテーブル] にあるすべてのサンプルに適用されます。 • [バッチ処理] を選択して、各キャリブレーションサンプルの化合物レスポンスが取得され、これを使用して各化合物の検量線を作成されます。
• 各化合物の検量線を確認します。	r [検量線] ペインで、右クリックしてショートカットメニューから [カーブフィットアシスタント] を選択します。 s カーブフィットテーブルで、[タイプ] が [二次曲線]、[原点] が [無視] の行を選択して、[無効なポイントの数] に最大 [0] を使用します。	• カーブフィットテーブルで、列名の横にあるフィルタアイコンをクリックします。[タイプ] フィルタアイコンをクリックして、[二次曲線] を選択すると、この化合物の二次曲線の検量線のみが表示されます。他の値でも試してみてください。



ステップ	詳細説明	コメント
	t カーブフィットテーブルで、別の行を選択すると、別の式のカーブフィットを確認できます。検量線としてより適切なカーブフィットがあればそれを選択し、検量線のグラフ領域で、右クリックしてショートカットメニューから [アシスタントカーブフィットの受け入れ] を選択します。 u [バッチテーブル] ツールバーで、右矢印をクリックして、キャリブレーションされた次の化合物を選択して、ステップ q から s を繰り返します。 v 上記のステップを繰り返し、8 つのキャリブレーションされた化合物すべてを確認して必要に応じて修正します。	• このカーブフィットは、上のステップ j では、グラフィックを確認しない方法で選択したものです。 • [検量線] ペインには、1 回に 1 つの化合物のキャリブレーションデータのみが表示されます。
	w [バッチ処理] ボタンをクリックし、バッチにあるすべてのサンプルを定量します。	• このステップは、上記の確認で検量線の候補となるカーブフィット式を変更した場合のみ必要です。
• データ解析メソッドの保存 	x メインメニューで、[メソッド] > [編集] を選択して、メソッドエディタを表示します。 y [メソッドタスク] ペインで、[保存 / 終了]、[名前を付けて保存] の順にクリックします。 z メソッド名に BenzoDA を入力し、[保存] ボタンをクリックします。	

タスク 13. 未知サンプルのバッチを定量

この実習では、前のタスクで作成した定量メソッドを使用して、未知のベンゼンサンプルの定量に使用するバッチを作成します。デモサンプルデータファイルには未知のベンゼンサンプルは含まれていません。未知サンプルのデータファイルを取得するには、28 ページの「タスク 10. MRM データの測定（オプション）」を実行してください。ファイルの場所。

ステップ	詳細説明	コメント
13 定量分析プログラムを開き、データを分析するバッチを作成します。 バッチに名前を付け、バッチディレクトリを割り当てます。	a Windows デスクトップの [QQQ 定量分析] アイコンをダブルクリックします。 b メインメニューから、[ファイル] > [新規バッチ] の順で選択し、[参照] ドロップダウンリストを使用して、3 つのベンゼンサンプルファイルを保存したフォルダに移動し、バッチ名 **BenzoSamples031709** を入力して、[開く] ボタンをクリックします。	• 定量分析ワークステーションが開きます。 • これは、プログラムディスクに格納されているディレクトリです。サンプルデータファイルをこのディレクトリにコピーしてください。
• バッチにサンプルを追加します。	c メインメニューから、[ファイル] > [サンプルの追加] の順に選択し、**BenzoSample01.D** から **BenzoSample03.D** までのサンプルを選択します。	
	d [OK] ボタンをクリックします。これで、バッチテーブルに 3 つの未知サンプルが含まれます。 e 必要に応じて、[タイプ] を [サンプル] に変更します。 f 必要に応じて、[希釈] および [アマウント] 列をバッチテーブルの [サンプル] セクションに追加します。値「1」をすべてのこれらの列のすべての [希釈] および [アマウント] に入力します。	• バッチには、サンプルを自動的に解析するためにデータ解析メソッドが必要です。

ステップ	詳細説明	コメント
	g メインメニューで、[メソッド] > [開く] > [既存ファイルから開いて適用] の順に選択し、[メソッドファイルを開く] ダイアログボックスを表示します。	
	h [ファイル名] に BenzoDA.quantmethod.xml を入力し、[開く] ボタンをクリックします。	• メソッドがバッチに適用されます。
	i [バッチ処理] ボタンをクリックし、バッチにあるすべてのサンプルを定量します。	
	j メソッドの各化合物についてサンプルの結果を確認します。	• 1 件または複数のレポートを印刷します。

www.agilent.com

©Agilent Technologies, Inc. 2009

第 1 版、2009 年 6 月

G6845-96001

Agilent Technologies